



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 317 714**

⑫ Número de solicitud: 200401839

⑬ Int. Cl.:
A01K 67/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **26.07.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2009**

Fecha de la concesión: **29.01.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **11.02.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Domingo Solans, Esteban y
Sevilla Hidalgo, Noemí**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA), su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

㉓ Resumen:

Animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA), su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es el agente causante de una enfermedad muy contagiosa y económicamente devastadora que afecta a animales de pezuña hendida y del que no existen modelos animales de fácil manejo. Un objeto de la invención lo constituye un animal útil como modelo experimental de una infección del VFA caracterizado porque es un roedor adulto que contiene una cantidad adecuada del VFA para provocar un proceso infeccioso sistémico y letal.

Otro objeto lo constituye el uso del animal modelo y su procedimiento de obtención en estudios de la patología del VFA, por ejemplo, para estudiar diferencias en la virulencia entre distintas variantes de VFA y los determinantes de dicha virulencia, así como evaluar nuevas vacunas y antivirales efectivos contra el VFA.

ES 2 317 714 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA), su procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un animal modelo de fiebre aftosa (FA), su procedimiento de obtención y sus aplicaciones en el estudio de la virulencia de dicho virus y en el desarrollo de aplicaciones terapéuticas frente a dicha enfermedad. Por lo tanto, se refiere a una invención del Sector Veterinario.

Estado de la técnica

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es un miembro de la familia *Picornaviridae*, género *Aphthovirus*, agente causante de una enfermedad muy contagiosa y económicamente devastadora que afecta a animales de pezuña hendida, caracterizada por la aparición de vesículas en las patas y el hocico (Bachrach, H. L. 1978. Foot-and-Mouth disease: world-wide impact and control measures, p. 299-310. In E. K. a. K. Maramorosch (ed.), Viruses and environment. Academic Press, Inc., New York, N.Y.; Rowlands, D. J. 2003. Foot-and-mouth disease. Virus Res 91: 1-161; Sobrino, F., and E. Domingo. 2004. Foot-and-mouth disease. Horizon Press, London). El impacto social y económico de FA puede ser catastrófico cuando un brote aparece en países libre de VFA con animales inmunológicamente naïve. Este fue el caso del brote de FA en Taiwan en 1997 y el del Reino Unido en 2001, en el que millones de animales infectados y en contacto fueron sacrificados con un coste directo e indirecto de billones de Euros (Gibbens, J. C., C. E. Sharpe, J. W. Wilesmith, L. M. Mansley, E. Michalopoulou, J. B. Ryan, and M. Hudson. 2001. Descriptive epidemiology of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in Great Britain: the first five months. Vet Rec 149: 729-43; Knowles, N. J., A. R. Samuel, P. R. Davies, R. P. Kitching, and A. I. Donaldson. 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. Vet Rec 148: 258-9; Yang, P. C., R. M. Chu, W. B. Chung, and H. T. Sung. 1999. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. Vet Rec 145: 731-4).

Similar a otros virus RNA, las poblaciones virales de VFA siguen una distribución dinámica de poblaciones en cuasiespecies como resultado de la alta tasa de mutaciones que ocurre durante la replicación de su genoma (revisado en Domingo, E., C. Biebricher, M. Eigen, and J. J. Holland. 2001. Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Landes Bioscience, Austin, TX). Este heterogeneidad genética y diversificación se ve reflejada en la gran diversidad serológica que presenta, con siete serotipos antigénicamente distintos, O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT3 y Asia 1 (Pereira, H. G. 1981. Foot-and-Mouth disease virus, p. 333-363. In G. RPG (ed.), Virus diseases of food animals, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y.). La inmunidad protectora frente a un serotipo no protege frente a otros serotipos lo que complica el diseño de vacunas. Asimismo, existen muchos subtipos dentro de un mismo serotipo. Por comparación de reactividad con anticuerpos monoclonales se ha demostrado que las poblaciones de VFA están compuestas por un continuo de variantes antigénicas, con sustituciones de amino ácidos que afectan varios sitios antigénicos dentro de la partícula viral (Mateu, M. G. 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. Virus Res 38:1-24). El diseño de vacunas efectivas se hace más difícil debido a la heterogeneidad antigénica dado que las vacunas deben acomodarse a las propiedades antigénicas de los virus circulantes.

Los mecanismos de patogenicidad y los determinantes de una inmunidad protectora a VFA no están bien caracterizados. Un entendimiento básico de estos mecanismos son necesarios para el diseño de vacunas que confieran protección completa. Los estudios que se pueden hacer con el hospedador natural son limitados debido a la complejidad del sistema y la falta de reactivos para definir los distintos componentes del sistema inmune que gobiernan dicha respuesta protectora. Inclusive el uso de cobayas está bastante limitado debido a la falta del conocimiento de factores genéticos y de reactivos para caracterizar la respuesta inmune (Balamurugan, V., R. Renji, S. N. Saha, G. R. Reddy, S. Gopalakrishna, and V. V. Suryanarayana. 2003. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type "O" produced in Pichia pastoris. Virus Res 92: 141-9; Bittle, J. L., R. A. Houghten, H. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, and F. Brown. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298: 30-3; Dunn, C. S., A. R. Samuel, L. A. Pullen, and J. Anderson. 1998. The biological relevance of virus neutralisation sites for virulence and vaccine protection in the guinea pig model of foot-and-mouth disease. Virology 247: 51-61; Huang, H., Z. Yang, Q. Xu, Z. Sheng, Y. Xie, W. Yan, Y. You, L. Sun, and Z. Zheng. 1999. Recombinant fusion protein and DNA vaccines against foot and mouth disease virus infection in guinea pig and swine. Viral Immunol 12: 1-8; Knudsen, R. C., C. M. Grocock, and A. A. Andersen. 1979. Immunity to foot-and-mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune responses. Infect Immun 24: 787-92; Nunez, J. I., E. Baranowski, N. Molina, C. M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo, and F. Sobrino. 2001. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. J Virol 75:3977-83). Para evitar alguno de estos problemas, un sistema adecuado podría ser el uso de ratones adultos en el que se conoce su genética y es un sistema manejable. El uso de ratones como sistema modelo se ha utilizado para el estudio de muchas enfermedades víricas tales como es el caso del virus de Ebola (Bray, M., K. Davis, T. Geisbert, C. Schmaljohn, and J. Huggins. 1998. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. J Infect Dis 178: 651-61), Hantaviruses (Wichmann, D., H. J. Grone, M. Frese, J. Pavlovic, B. Anheier, O. Haller, H. D. Klenk, and H. Feldmann. 2002. Hantaan virus infection causes an acute neurological disease that is

fatal in adult laboratory mice. *J Virol* 76: 8890-9), el virus de Dengue (Huang, K. J., S. Y. Li, S. C. Chen, H. S. Liu, Y. S. Lin, T. M. Yeh, C. C. Liu, and H. Y. Lei. 2000. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol* 81: 2177-82), el virus de la encefalitis equina venezolana (Gleiser, C. A., W. S. Gochenour, Jr., T. O. Berge, and W. D. Tigertt. 1961. Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. I. Modification by cortisone of the response of the central nervous system of *Macaca mulatta*. *J Immunol* 87: 504-8; Jackson, A. C., S. K. SenGupta, and J. F. Smith. 1991. Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis virus infection in mice and hamsters. *Vet Pathol* 28: 410-8) y el virus de Herpes simple (Hayashi, K., Y. Iwasaki, and K. Yanagi. 1986. Herpes simplex virus type 1-induced hydrocephalus in mice. *J Virol* 57: 942-51), entre otros. El uso de estos modelos murinos ha ayudado a elucidar muchos mecanismos de patogenia de los diferentes virus que hubiera sido muy difícil de obtener usando los hospedadores naturales.

Skinner (Skinner, H. 1951. One week old white mice as test animals in FMD research. *Proc. Roy. Soc. Med.* 44: 1041-1044) ya demostró que ratones recién nacidos podían ser infectados por vía peritoneal con distintos serotipos de VFA. Desde entonces, el modelo de ratones lactantes ha sido usado extensivamente por muchos laboratorios para la detección y titulación de virus y para tests de neutralización (Heatley, W., H. H. Skinner, and H. Surak-Sharpe. 1960. Influence of route of inoculation and strain of mouse on infectivity titrations of the virus of foot-and-mouth diseases. *Nature* 186: 909-11; Skinner, H. H., W. M. Henderson, and J. B. Brooksby. 1952. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature* 169: 794-5; Subak-Sharpe, H. 1961. The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch Gesamte Virusforsch* 11: 373-99). VFA induce una rápida y fatal infección en estos ratones caracterizado por parálisis muscular de las patas traseras, mostrando cambios severos degenerativos en los músculos de las patas y en músculo esquelético y miocardio (Platt, H. 1956. A study of the pathological changes produced in young mice by the virus of foot-and-mouth disease. *J Pathol Bacteriol* 72: 299-312). Sin embargo, esta susceptibilidad decrece rápidamente con la edad, de tal manera que ratones entre 3 y 4 semanas raramente desarrollan algún tipo de sintomatología. De hecho, parece haber un acuerdo en la literatura que ratones adultos normales no muestran enfermedad o sintomatología inclusive cuando son inoculados con dosis grandes de VFA (Borca, M. V., F. M. Fernandez, A. M. Sadir, M. Braun, and A. A. Schudel. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59: 261-7; Lopez, O. J., A. M. Sadir, M. V. Borca, F. M. Fernandez, M. Braun, and A. A. Schudel. 1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 24: 313-21; Piatti, P. G., A. Berinstein, O. J. Lopez, M. V. Borca, F. Fernandez, A. A. Schudel, and A. M. Sadir. 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol* 72 (Pt 7): 1691-4; Subak-Sharpe, H. 1961. The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch Gesamte Virusforsch* 11: 373-99). Una infección subclínica se produce en algunas cepas de ratón adulto (Fernández, F. M., M. V. Borca, A. M. Sadir, N. Fondevila, J. Mayo, and A. A. Schudel. 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet Microbiol* 12: 15-24). Se establece una viremia que dura 48 a 72 h post-inoculación y produce anticuerpos neutralizantes cuyo pico coincide con la eliminación del virus (Borca, M. V., F. M. Fernandez, A. M. Sadir, M. Braun, and A. A. Schudel. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59: 261-7; López, O. J., A. M. Sadir, M. V. Borca, F. M. Fernandez, M. Braun, and A. A. Schudel. 1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 24: 313-21). Este sistema modelo se ha utilizado para estudiar algunos aspectos de la respuesta inmune contra el VFA (Perez Filgueira, D. M., A. Berinstein, E. Smitsaart, M. V. Borca, and A. M. Sadir. 1995. Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. *Vaccine* 13: 953-60; Piatti, P. G., A. Berinstein, O. J. Lopez, M. V. Borca, F. Fernandez, A. A. Schudel, and A. M. Sadir. 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol* 72 (Pt 7): 1691-4; Wigdorovitz, A., P. Zamorano, F. M. Fernandez, O. Lopez, M. Prato-Murphy, C. Carrillo, A. M. Sadir, and M. V. Borca. 1997. Duration of the foot-and-mouth disease virus antibody response in mice is closely related to the presence of antigen-specific presenting cells. *J Gen Virol* 78 (Pt 5): 1025-32). Sin embargo, es un modelo poco útil para el estudio del papel de la respuesta inmune y los factores genéticos involucrados en la patogénesis de VFA debido a la falta de sintomatología asociada con la infección.

En resumen, el virus de la fiebre aftosa (VFA) es un picornavirus que causa una enfermedad vesicular en animales de pezuña hendida. Este virus continua siendo un peligro para el ganado a nivel mundial, causando todavía brotes que suponen grandes pérdidas económicas. A pesar de todo, se conoce muy poco sobre la patología de VFA, debido parcialmente a las dificultades e inconvenientes que supone trabajar con los hospedadores naturales, ganado porcino y bovino.

Compendio

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos modelos animales de infección del virus de la fiebre aftosa (VFA).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que roedores adultos, preferentemente, ratones adultos C57BL/6 y BALB/C son altamente susceptibles a la infección por VFA cuando el virus es administrado de tal forma que se evita una pronta intervención del sistema inmune que elimina el VFA. Debido

a que una respuesta antiviral protectora en un animal es altamente dependiente de la migración de diferentes componentes del sistema inmune al sitio de inoculación, inicialmente se eligió la inyección subcutánea (sc) en la almohadilla plantar para facilitar la diseminación del virus sin la pronta intervención del sistema inmune que pudiese llevar a la eliminación del virus, y posteriormente se utilizó la vía intraperitoneal (ip). En esas condiciones, las diferentes cepas de ratones usadas mostraron distinta susceptibilidad a VFA (Figura 1, ver Ejemplo 1). Los primeros síntomas clínicos fueron pelo erizado, apatía, postura encorvada y depresión, seguido de síntomas neurológicos como parálisis de las patas traseras. Después de 2-3 días de la aparición de síntomas, los animales murieron. Las inoculaciones sc e ip de ratones C57BL/6 con VFA fueron ambas letales, aunque la inoculación ip causó la muerte más rápido, lo que permite elegir cada tipo de inoculación según el interés de cada caso. El análisis de virus replicativo en diferentes tejidos indicó una infección sistémica, encontrándose virus en la mayoría de los órganos. Asimismo, los animales mostraron lesiones microscópicas en muchos órganos similares a aquellas lesiones descritas en el hospedador natural (Meyer, R. F., and R. C. Knudsen. 2001. Foot-and-mouth disease: a review of the virus and the symptoms. J Environ Health 64: 21-3). Los ratones desarrollaron microvesículas cerca de la placa basal del epitelio, hecho que precede la típica vesiculación característica de FA. Asimismo, se observó una depleción linfocítica en bazo y timo así como una severa linfopenia en ratones infectados. Finalmente, cuando estos ratones se inmunizaron con vacuna convencional de VFA inactivada químicamente se observó un 100% de protección después de un desafío (infección) con una dosis letal de VFA (ver Ejemplo 4).

Este nuevo modelo murino para el estudio de la patología de VFA tiene características únicas que abren la posibilidad de estudiar en el mismo sistema huésped- virus la susceptibilidad y resistencia a una infección letal, inmunología de la infección y eficacia de vacunas, de manera que no se pueden llevar a cabo en el hospedador natural o en otro sistema modelo para VFA. A diferencia de otros sistemas, la ventaja del modelo de roedor, preferentemente con ratones, es no sólo la disponibilidad de una gran variedad de reactivos sino también el uso de ratones singénicos con una historia genética uniforme. Además, el potencial de usar ratones alterados genéticamente para el estudio de muchos aspectos de la respuesta inmune del virus abre nuevos campos de investigación en el análisis de la respuesta inmune en la infección con VFA *in vivo*.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA), en adelante animal de la presente invención, caracterizado porque es un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, que contiene una cantidad adecuada del VFA para provocar un proceso infeccioso sistémico y letal.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención, en adelante procedimiento de obtención de la invención, caracterizado porque consiste en la inoculación del VFA en un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, en una localización que impide la intervención del sistema inmune, preferentemente por vía subcutánea (sc) en la almohadilla plantar de la pata del animal o intraperitoneal (ip), y en una cantidad adecuada de VFA para inducir un proceso de infección sistémico y letal.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del procedimiento de obtención de la invención para la obtención del animal de la invención, así como el animal obtenido específicamente por dicho procedimiento.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del animal y del procedimiento de obtención del mismo de la presente invención en estudios de la patología del VFA, por ejemplo, para estudiar diferencias en la virulencia entre distintas variantes de VFA y los determinantes de dicha virulencia, así como para evaluar nuevas vacunas (ver Ejemplo 4) y antivirales efectivos contra el VFA.

Descripción detallada

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA), en adelante animal de la presente invención, caracterizado porque es un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, que contiene una cantidad adecuada del VFA para provocar un proceso infeccioso sistémico y letal.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “proceso infeccioso sistémico y letal” se refiere a que el VFA afecta a la mayoría de los tejidos del animal, provoca una linfopenia y conduce a la muerte del animal.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “virus de la fiebre aftosa (VFA)” se refiere a cualquier VFA perteneciente a cualquiera de los serotipos antigénicamente identificados: O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT3 y Asia 1, subtipos, variantes antigénicas o subespecies descritas hasta la fecha o en futuro (Pereira, H. G. 1981. Foot-and-Mouth disease virus, p. 333-363. In G. RPG (ed.), Virus diseases of food animals, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y.; Mateu, M. G. 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. Virus Res 38: 1-24; Domingo, E., C. Biebricher, M. Eigen, and J. J. Holland. 2001. Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Landes Bioscience, Austin, TX).

Tal como se utiliza en la presente invención el término “adulto” se refiere a ratones de más de 8 semanas.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “cantidad adecuada de VFA” se refiere a la cantidad suficiente de virus de fiebre aftosa para provocar un proceso infeccioso sistémico y letal.

ES 2 317 714 B1

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el animal de la invención caracterizado porque es un ratón adulto perteneciente al siguiente grupo: C57BL/6, BALB/C o Swiss (ver Ejemplo 1).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención, en adelante procedimiento de obtención de la invención, caracterizado porque consiste en la inoculación del VFA en un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, en una localización que impide la intervención del sistema inmune, preferentemente por vía subcutánea (sc) en la almohadilla plantar de la pata del animal o intraperitoneal (ip), y en una cantidad adecuada de VFA para inducir un proceso de infección sistémico y letal.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que la inoculación se realiza por vía subcutánea (sc) en la almohadilla plantar de la pata del ratón.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que la inoculación se realiza por vía intraperitoneal (ip).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que el VFA es seleccionado entre los perteneciente a cualquiera de los serotipos antigénicamente identificados: O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT3 y Asia 1, sus subtipos, sus variantes antigénicos o sus subespecies.

Adicionalmente, una realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que el VFA, es seleccionado entre los pertenecientes al siguiente grupo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención: A22, SAT-1, CS8c-1, O, CS8cip100 y MARL3 (ver Ejemplo 2).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que la dosis adecuada de VFA se encuentra entre 10^1 y 10^7 UFP de VFA y, más preferentemente, entre 10^3 y 10^6 UFP de VFA.

Tal como se comenta posteriormente con ratones C57BL/6 se han utilizado dosis en un rango desde 10 UFP hasta 10^6 UFP. Estos ratones empezaron a morir con 10^2 UFPs de VFA. La dosis idónea para ensayos de vacunas o antivirales que se usó fue de 10^4 UFPs de VFA con la que murieron el 100% de los ratones a las 48 h. Por otro lado, en ratones BALB/C se usaron rangos de 10 hasta 10^5 UFPs de VFA, siendo la dosis recomendada para ensayos de vacunas de 10^3 UFPs ya que la dosis letal infectiva es mucho menor para esta cepa de ratón. Finalmente, los ratones Swiss se inocularon con un rango desde 10 hasta 10^5 UFPs de VFA, aunque el porcentaje de mortalidad en estos ratones fue muy baja.

Así, una realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que el animal es un ratón adulto C57BL/6 y en el que la dosis adecuada de VFA utilizada es de 10^4 UFPs.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención del animal de la invención en el que el animal es un ratón adulto BALB/C y en el que la dosis adecuada de VFA utilizada es de 10^5 UFPs.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del procedimiento de obtención de la invención para la obtención del animal de la invención, así como el animal obtenido específicamente por dicho procedimiento.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del animal y del procedimiento de obtención del mismo de la presente invención para realizar estudios de la patología del VFA, por ejemplo, para estudiar diferencias en la virulencia entre distintas variantes de VFA y los determinantes de dicha virulencia, así como para evaluar vacunas y antivirales efectivos contra el VFA.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso del animal y del procedimiento de obtención de la presente invención en la evaluación de la eficacia de una vacuna (ver Ejemplo 4), frente al virus de la fiebre aftosa que comprende los siguientes pasos:

- a) vacunación de un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, con una cantidad adecuada de la vacuna a evaluar,
- b) determinación del estado de inmunización del animal,
- c) desafío o infección del animal de b) con una cantidad adecuada del VFA, y
- d) determinación de la eficacia de la vacuna de acuerdo a los niveles de mortalidad entre los animales vacunados y el grupo control (no vacunado).

Una realización particular de la invención lo constituye el uso del animal y del procedimiento de obtención de la presente invención en la evaluación de la eficacia de una vacuna en el que la vacuna de VFA es una vacuna inactivada químicamente o es un virus atenuado.

5 Descripción de las figuras

Figura 1.- *Susceptibilidad de ratones adultos a la infección por VFA*. Diferentes cepas de ratones de laboratorio (8 semanas de edad, 6 ratones por grupo) fueron inoculados sc en la almohadilla plantar con 10^5 UFP de VFA C-S8c1. Los ratones se monitorizaron cada 4 h durante las primeras 48 hpi y cada 24 h durante 7 días. Excepto para ratones SJL/J, todas las demás cepas de ratón mostraron susceptibilidad a la infección. C56BL/6 y BALB/c mostraron un curso de enfermedad similar. Los procedimientos se detallan en Materiales y Métodos.

Figura 2.- *Curvas de supervivencia de ratones C57BL/6, BALB/c, SJL/J y Swiss infectados con VFA C-S8c1*. Los ratones (8 semanas de edad, 6 ratones por grupo) fueron infectados sc en la almohadilla plantar con diluciones seriadas de 10 de VFA C-S8c1, el número de UFPs inoculadas se indica en cada curva. Los valores de LD_{50} se dan en el texto, y procedimientos se detallan en Materiales y Métodos.

Figura 3.- *Títulos de VFA C-S8c1 en suero y órganos de ratones C57BL/6*. Los ratones (8 semanas de edad) se inocularon en la almohadilla plantar con 10^4 UFPs de VFA C-S8c1. (A) Títulos virales en suero se determinaron como se indica en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio del título de 4 animales. El límite de detección es de aproximadamente 10 UFPs. Los datos se expresan como UFP/ml \pm SD. (B) A los tiempos indicados pi, 4 ratones por grupo se sacrificaron y corazón, pulmón, cerebro, riñón, hígado, páncreas, bazo, timo y nódulo linfático de drenaje (poplíteo) se cogieron para determinar el título viral. El límite de detección es aproximadamente de 10 UFPs. Se dan desviaciones estándar. Procedimientos se detallan en Materiales y Métodos.

Figura 4.- *Virulencia de diferentes serotipos de VFA y variantes para ratones C57BL/6*. Los ratones (8 semanas de edad, 6 por grupo) se inocularon sc en la almohadilla plantar con diluciones seriadas de 10 para cada virus. (A) Curvas de supervivencia de ratones infectados con VFA SAT1 o A22. (B) Curvas de supervivencia de ratones infectados con C-S8clp100 o C-S8c1 MARLS. El número de UFPs administradas a los ratones se indica encima de cada curva. Valores juntos indican que las curvas se superimponen. Valores LD_{50} se dan en el texto y procedimientos se detallan en Materiales y Métodos.

Figura 5.- *Secciones de tejidos de pulmón y timo de ratones C57BL/6 infectados con VFA*. Los ratones fueron infectados con 10^4 UFPs de VFA sc en la almohadilla plantar. Los tejidos se cogieron a las 48 hpi. Se muestra la tinción con hematoxilina y eosina. (A) Timo de ratones inoculados. Hiperemia y depleción linfocítica, mayoritariamente en el neocortex, con la presencia de cuerpos tangibles macrófagos que confiere la típica apariencia de cielo estrellado. 100x (B) timo de un ratón no inoculado. 100x (C) Pulmón de un animal inoculado. Se observa hiperemia y un incremento en los septos alveolares. 200x (D) Pulmón de animales no inoculados (naive). 200x. Procedimientos se detallan en Materiales y Métodos.

Figura 6.- *Secciones de tejidos de la almohadilla plantar de ratones C57BL/6 inoculados con VFA*. Los ratones se infectaron con 10^4 UFPs de VFA subcutáneamente en la almohadilla plantar. Los tejidos se cogieron a las 48 hpi. Se muestra tinción con hematoxilina y eosina. (A) Animal inoculado. Edema intracelular, vacuolización y picnosis de las células en el estrato espinoso (flechas). 630x (B) Animal inoculado. Edema intracelular en el estrato espinoso y formación de una vesícula suprabasilar (flecha) 400x (C) Animal no inoculado. 400x. Procedimientos se detallan en materiales y métodos.

Figura 7.- *Linfopenia y depleción de células T en ratones C57BL/6 infectados con VFA*. Los ratones se inocularon en la almohadilla plantar con 10^4 UFPs de VFA C-S8c1 y sacrificados a las 24 hpi. (A) Se cogió sangre y células blancas (WBC) y linfocitos se contaron como se describe en Materiales y Métodos. Leucocitos se indican como: células mononucleares (M), células polimorfonucleares (PMN) y linfocitos (L). Los valores se compararon a las muestras control obtenidas de ratones sin infectar. Los datos se muestran como el resultado promedio \pm SD, con n=8 para ratones infectados y n=5 para los controles. Los asteriscos indican una diferencia significativa en la reducción en ratones infectados comparadas con ratones control (test de Student $p<0.05$) (B) Los bazo se cogieron de ratones infectados con VFA y ratones control a las 24 hpi. Se determinó el número total de células de bazo por conteo. Por citometría de flujo se determinó el número de células $CD4^+$ y $CD8^+$. Un mínimo de 50,000 acontecimientos se adquirieron, y los datos se representaron como el porcentaje de acontecimientos positivos \pm SD para cada población de células T. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre ratones inoculados y controles (test de Student, $p<0.05$)

Figura 8.- *Protección en ratones C57BL/6 vacunados frente al desafío de una dosis letal de VFA*. Los ratones (8 semanas de edad, 18 por grupo) se inmunizaron dos veces por administración i de vacuna inactivada, preparada según se describe en Materiales y Métodos. (A) Suero de ratones previamente a la inmunización (pre-inmune), el día de la segunda inmunización (2^{da} boost), día del desafío con el virus (10^4 UFPs de VFA C-S8c1 en la almohadilla plantar) y 48 hpi se usó para determinar el título de anticuerpos anti-VFA por ELISA, como está descrito en Materiales y Métodos. A diferencia de los animales control (no se muestra), todos los animales inmunizados mostraron una respuesta de anticuerpos, indicativo de una buena inmunización (B) Mientras todos los animales sin inmunizar (controles) murieron, la inmunidad protectora fue del 100% en los ratones previamente inmunizados.

Ejemplos de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran modos de realización de la presente invención, no considerándose en modo alguno limitativos de la misma.

Ejemplo 1

El serotipo C del VFA causa una infección Letal en ratones adultos de laboratorio por vía subcutánea e intraperitonealmente

Como se ha indicado anteriormente es posible la detección de una viremia en ratones adultos después de una inoculación ip con diferentes serotipos de VFA, aunque los ratones no mostraron ningún síntoma clínico o muerte (Fernández, F. M., M. V. Borca, A. M. Sadir, N. Fondevila, J. Mayo, and A. A. Schudel. 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. Vet Microbiol 12: 15-24). En un intento de desarrollar un modelo de roedor adulto para VFA en el que se mostrasen síntomas de enfermedad hemos testado la susceptibilidad de distintas cepas de ratón de laboratorio a VFA C-S8c1. Ratones adultos C57BL/6, BALB/C, SJL/J y Swiss (8 semanas de edad) fueron inoculados subcutáneamente (sc) en la almohadilla plantar de la pata izquierda (LRFP) con 10^5 UFPUs de VFA C-S8c1. Debido a que una respuesta antiviral protectora es altamente dependiente de la migración de diferentes componentes del sistema inmune al sitio de inoculación, se eligió la inyección sc en la almohadilla plantar para facilitar la diseminación del virus sin la pronta intervención del sistema inmune que pudiese llevar a la eliminación del virus. En esas condiciones, las diferentes cepas de ratones usadas mostraron distinta susceptibilidad a VFA (Figura 1). Los ratones SJL/J no mostraron ningún síntoma o muerte después de la inoculación con el virus. Ratones Swiss, BALB/C y C57BL/6 mostraron susceptibilidad a la infección y un curso de la enfermedad similar entre las 3 cepas. Los síntomas se caracterizaron por apatía, pelo erizado, postura encogida y hemaciación a las 24 h post-inoculación. A estadios tardíos de la enfermedad los animales desarrollaron signos neurológicos como ataxia en las patas traseras. La rápida progresión de la enfermedad llevó a la muerte a la mayoría de los animales entre 48 y 72 h post-inoculación (Figura 1). Valores de LD_{50} fueron de 50 UFP para C57BL/6, 10^4 UFP para BALB/C y 10^6 UFP para Swiss; ratones SJL/J fueron resistentes a la infección (Figura 2), lo que sugiere que la susceptibilidad del ratón a VFA puede estar ligado a factores genéticos. Dado que ratones C57BL/6 mostraron la susceptibilidad más alta a VFA, esta cepa de ratón fue la usada en el resto de los experimentos.

Para evaluar la influencia de la ruta de inoculación en el desarrollo de la enfermedad, la virulencia de VFA C-S8c1 en ratones C57BL/6 se determinó después de una inoculación intraperitoneal (ip). C-S8c1 fue más virulento después de inoculación ip, con un valor de LD_{50} de 10 UFP. Esto indica una gran influencia de la ruta de inoculación en el desarrollo de la enfermedad.

Para determinar la diseminación del virus de la almohadilla plantar al suero u otros tejidos, se llevaron a cabo estudios de cinética y se determinó el título viral en suero y diferentes tejidos (nódulo linfático de drenaje (poplíteo) [PLN], bazo, timo, páncreas, hígado, pulmón, corazón y cerebro) después de la inoculación sc con 10^4 UFPs de C-S8c1 (Figura 3). Los títulos virales en suero mostraron un pico entre las 24 y 36 horas post-inoculación (hpi) entre 10^6 y 10^7 UFP/ml (Figura 3A). El primer tejido que el virus alcanza es el hígado (Figura 3B), donde el virus es detectado tan pronto como a las 4 hpi (10^2 UFP/g), con títulos virales incrementándose hasta la muerte (alcanzando títulos de 10^4 UFP/g). A las 8 hpi, la replicación viral se detectó en bazo, páncreas, corazón y timo, alcanzando valores máximos a las 24 hpi (10^4 UFP/g), y disminuyendo a las 36 hpi (10^3 UFP/g). La infectividad viral fue menor que los límites de detección de la técnica (10 UFP/g) en los pulmones y el cerebro hasta las 24 hpi (10^3 y 10^2 UFP/g, respectivamente), lo que sugiere una diseminación más lenta a estos tejidos (Figura 3B). Se detectó virus en todos los órganos testados, lo que indica una infección sistémica. En general, el virus no se eliminó de ningún órgano y permaneció en o cerca del pico de título hasta la muerte del animal. La única excepción fue el PLN en el que la replicación del virus se detectó a las 24 hpi (100 UFP/g) y luego bajó por debajo de los límites de detección a las 48 hpi (Figura 3B). Estos resultados sugieren que el virus no se esparce al PLN como primer sitio de replicación y que la replicación puede tener lugar principalmente en o cerca del punto de inoculación, y después esparcirse al resto del cuerpo.

Ejemplo 2

Susceptibilidad de ratones C57BL/6 a otros serotipos de VFA y variantes

Para determinar si los ratones C57BL/6 eran susceptibles a otros serotipos de VFA distinto al C (C-S8c1), ratones C57BL/6 fueron inoculados en LRFP con diluciones seriadas de 10 de VFA A22 y SAT-1. Ratones infectados con SAT-1 mostraron sintomatología similar a aquella descrita con VFA C-S8c1, con una LD_{50} de 10 UFPs, similar al LD_{50} de C-S8c1 (Figura 4A). Sin embargo, ratones inoculados con A22 mostraron un curso remarcablemente diferente a los otros serotipos (Figura 4A). Con la mayor dosis usada para inocular ratones C57BL/6 (10^5 UFPs), sólo un 33% de los ratones murieron con síntomas similares a los observados después de la infección con VFA C-S8c1 o SAT-1. Así, ratones C57BL/6 mostraron distinta susceptibilidad a 3 serotipos de VFA, C, A y SAT-1.

Por otro lado, ratones C57BL/6 desarrollaron la enfermedad y murieron a las 36-48 horas tras ser infectados con el VFA O, como descrito para otros serotipos; su LD_{50} de 10^2 , un poco más alto que para otros serotipos.

Asimismo, se llevaron a cabo experimentos para determinar la susceptibilidad de ratones C57BL/6 a 2 variantes de C-S8c1 generados por pases seriados de C-S8c1 en células BHK (Charpentier, N., M. Davila, E. Domingo, and C. Escarmis. 1996. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* 223: 10-8; Martinez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, and E. Domingo. 1997. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6798-802). Elegimos C-S8c1p100, la población resultante después de 100 pases del virus C-S8c1 en células BHK, que muestra una mayor virulencia en células BHK que el parental C-S8c1 (Martinez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, and E. Domingo. 1997. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6798-802). El segundo variante testado fue el MARLS, una población clonal seleccionada del virus C-S8c1 pasado 200 veces en células BHK por su resistencia a un anticuerpo monoclonal (Charpentier, N., M. Davila, E. Domingo, and C. Escarmis. 1996. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* 223: 10-8). C-S8c1 p100 mostró un LD₅₀ de 10⁵ UFPs, aproximadamente 103 veces más alta que la de su parental C-S8c1, mientras MARLS no causó ninguna muerte en ratones C57BL/6 inclusive a la mayor dosis de infección usada (10⁶ UFPs) (LD₅₀ > 10⁶ UFPs) (Figura 4B). Estos datos sugieren que ratones C57BL/6 son adecuados para detectar diferencias en virulencia entre distintos variantes de VFA, y que múltiples pases de VFA C-S8c1 en células BHK resultan en un incremento en la virulencia para células BHK pero una disminución en la virulencia para ratones C57BL/6.

Ejemplo 3

La infección de ratones adultos por VFA causa lesiones microscópicas que son características de VFA

Para tener una mejor descripción del sistema y entender las causas de la enfermedad letal causada por VFA en ratones adultos se llevaron a cabo análisis histológicos de varios órganos obtenidos de ratones C57BL/6 infectados y sin infectar como control. Una descripción general indica un medio o severo edema en las cavidades del cuerpo, mayoritariamente en el hidrotorax e hidropericardio, edema subcutáneo en el área cervical, corazón más grande y pulmones enrojecidos. El examen histológico del corazón mostró signos de dilatación, mayoritariamente en el ventrículo derecho. Los pulmones mostraron hiperemia con un pequeño incremento del tamaño de los septum (Figura 5C, D). Una pequeña a severa depleción linfocítica se observó en el timo, con un incremento en la presencia de macrófagos “cuerpos tangibles”, mostrando la típica apariencia de cielo estrellado (Figura 5A, B). Interesantemente, el bazo y los nódulos linfoides poplíteo no mostraron cambios significativos. La hendidura plantar mostró un incremento en la degeneración de las células del estrato espinoso, mayoritariamente cerca de la capa basal, mostrando edema intracelular y núcleos picnóticos. Además, el edema intracelular se encontró también en el estrato espinoso y ocasionalmente, se encontraron microvesículas cerca de la capa basal (Figura 6). Los tipos de lesiones encontradas son típicas de una enfermedad vesicular y se han observado en la infección con VFA de varios hospedadores naturales (Meyer, R. F., and R. C. Knudsen. 2001. Foot-and-mouth disease: a review of the virus and the symptoms. *J Environ Health* 64: 21-3). Este resultado sugiere que ratones C57BL/6 responden a la infección con VFA con microlesiones típicas de una enfermedad vesicular que no evolucionan a producir una vesiculación macroscópica. Por otro lado, las lesiones que VFA produce en ratones adultos C57BL/6 son muy diferentes, en muchos aspectos, a aquellos descritos para ratones neonatos (Platt, H. 1956. A study of the pathological changes produced in young mice by the virus of foot-and-mouth disease. *J Pathol Bacteriol* 72: 299-312). En ratones de 7 días de edad, VFA tiene un claro tropismo por el miocardio, produciendo una extensiva destrucción del músculo estriado, mientras que en animales adultos produce una reacción epitelial. De manera similar, en vacuno el virus puede producir muerte muy rápida en terneros por un efecto necrotizante en tejido de músculo estriado, mientras en vacuno adulto las lesiones son predominantemente epiteliales (Bautista, E. M., G. S. Ferman, and W. T. Golde. 2003. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 61-73).

Además, se observó una profunda linfopenia y depleción linfocítica durante la fase aguda de la infección de ratones con VFA. Para ello estudiarlo en detalle, linfocitos y células blancas de la sangre (WBC) fueron monitorizadas en ratones C57BL/6 infectados con VFA. Los ratones se inocularon con 10⁴ UFPs de VFA C-S8c1 o PBS en la LRFP. Comparados con los ratones inoculados con PBS, a las 24 hpi los ratones infectados con VFA mostraron una disminución significativa ($P < 0.001$) en linfocitos y WBC (Figura 7A). La proporción de monocitos (M), leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos en sangre de ratones infectados con VFA fue significativamente alterada comparado con los animales control (Figura 7A). La disminución en el porcentaje de linfocitos y correspondiente incremento en el porcentaje de PMN sugiere que la pérdida de WBC puede ser atribuido a la pérdida de linfocitos relativo a los animales control.

La rápida eliminación de los linfocitos pudiera ser debido a que las células están siendo secuestradas de la circulación o a una migración a los tejidos linfoides, o a una apoptosis inducida por el virus. Para determinar si la depleción linfocítica ocurrió también en tejido linfocítico, linfocitos del bazo fueron analizados por citometría de flujo. Ratones C57BL/6 fueron inoculados en la LRFP con 10⁴ UFPs de VFA C-S8c1. A las 24 hpi, se recogieron los bazos de animales infectados y animales control, mostrando los animales infectados un profundo incremento en el tamaño del bazo. El recuento de células del bazo mostró un incremento de 4 veces en el número de esplenocitos (Figura 7B). El marcaje doble para detectar linfocitos CD4 y CD8 identificó una pérdida significativa de células CD4⁺ y CD8⁺ en el bazo de ratones infectados con VFA (Figura 7B). La inducción de la pérdida de células T afecta a ambos tipos de células de manera igual, sin diferencias estadísticamente significativas entre la pérdida de células T CD4 y CD8 en los

ratones infectados. Estos datos indican que la depleción linfóide también ocurre en órganos linfoides, lo que sugiere que los linfocitos pueden morir debido a la infección viral. Este efecto probablemente juegue un papel importante en el esparcimiento del virus de manera sistémica, creándose un estado de inmunodepresión, y causando la muerte del animal.

Ejemplo 4

Ratones inmunizados están completamente protegidos contra un desafío letal de VFA

El curso clínico, distribución del virus en el organismo y los datos de patología indican que el VFA causa una infección sistémica letal en ratones C57BL/6 inmunocompetentes adultos. Para proveer más pruebas de que el VFA es el agente causante de la enfermedad en estos animales y que los ratones pueden responder a una vacuna de VFA, se llevaron a cabo ensayos de protección con vacunas. Ratones adultos C57BL/6 fueron inmunizados con una vacuna inactivada químicamente de VFA C-S8c1 (Bahnmann, H. G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch Virol 47: 47-56). La vacuna se administró mediante 2 inyecciones consecutivas del equivalente a 10^6 UFP de VFA C-S8c1 a intervalos de 2 semanas. Después de cada inyección se determinaron títulos de anticuerpo mediante ELISA. Todos los animales inmunizados, pero no los controles inoculados con PBS, desarrollaron una respuesta de anticuerpos lo que indica que fueron inmunizados (Figura 8A). Subsecuentemente, después de 2 semanas de la última inmunización, animales inmunizados y controles se desafiaron con 10^4 UFPs de VFA C-S8c1 mediante inyección en la almohadilla plantar. Mientras todos los animales control murieron, el 100% de los ratones inmunizados fueron protegidos frente a un desafío con una dosis letal (Figura 8B). Este resultado indica que se consiguió una inmunidad protectora con éxito, y apoya la noción de que el VFA es el agente causante de la enfermedad letal en ratones C57BL/6.

Además, se realizó otro ensayo de vacunación. Ratones adultos C57BL/6 fueron inmunizados mediante inyección sc con 10^4 UFPs de una variante de C-S8c1, denominado C₁₀180, que es un variante de C-S8c1 pasado en cultivos celulares y con una gran pérdida de eficacia biológica comparado con el virus parental (C-S8c1), es decir, es un virus atenuado (Escarmís, C; Dávila, M and Domingo, E. Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. J Mol Biol. 1999, 285: 495-505). Los ratones sobrevivieron sin ningún tipo de sintomatología asociada a la infección. A los 15 días post-inoculación se les desafió con una dosis letal de C-S8c1 (10^4 UFPs mediante inyección en la almohadilla plantar). Mientras todos los animales control murieron, el 100% de los ratones inmunizados fueron protegidos frente a un desafío con una dosis letal.

Materiales y métodos

Animales. Ratones C57BL/6, BALB/C, SJL/J y Swiss se compraron a Harlan Interfauna Iberica, S.L. Todos los ratones usados en este estudio fueron hembras entre 8-10 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron bajo unas condiciones libre de cualquier otro patógeno y se permitió una aclimatación a las instalaciones BSL3 del animalario del Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Madrid, durante 1 semana antes de llevar a cabo algún experimento. Todos los experimentos con animales vivos se llevaron a cabo según la normativa 86/609 de la CEE, y fueron aprobados por el comité ético correspondiente.

Células y virus. Los virus fueron crecidos en células de riñón de hamster lactante (BHK) como se ha descrito (Domingo, E., M. Davila, and J. Ortin. 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. Gene 11:333-46). Los procedimientos para la infección de monocapas de células BHK en medio líquido y para ensayo de plaqueo en agar semisólido se han descrito previamente (Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguer, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. J Virol 72: 6362-72; Domingo, E., M. Davila, and J. Ortin. 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. Gene 11: 333-46; Sobrino, F., M. Davila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. Virology 128: 310-8). El VFA C-S8c1 es un aislado purificado de una placa viral del aislado natural C₁-Sta Pau-Spain 70, un virus representativo del subtipo europeo C₁ (Sobrino, F., M. Davila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. Virology 128: 310-8). El VFA C-S8c1p100 es el virus C-S8c1 propagado 100 veces en cultivos celulares (Martinez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, and E. Domingo. 1997. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 6798-802). El VFA MARLS es un mutante de escape a anticuerpo monoclonal obtenido de la población de VFA C-S8c1p213 (C-S8c1 propagado 213 veces en células BHK) (Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguer, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. J Virol 72: 6362-72; Charpentier, N., M. Davila, E. Domingo, and C. Escarmis. 1996. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. Virology 223: 10-8). Los VFA A22 y SAT1 fueron proporcionados por E. Blanco, Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Madrid.

Infección de animales y preparación de muestras. Los ratones fueron inoculados con VFA subcutáneamente (sc) en la pata trasera izquierda (LRFP), en un volumen de 50 μ l o intraperitonealmente (i.p.) con un volumen de 100 μ l con cantidades distintas de virus. Los ratones se examinaron para detectar síntomas clínicos dos veces al día. La dosis

letal infecciosa (LD_{50}) fue calculada de acuerdo al método de Reed and Muench (Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493), después de la inoculación de los ratones con diluciones seriadas de 10 del virus. A diferentes tiempos post-inoculación algunos ratones fueron sacrificados y distintos órganos (hígado, pulmones, bazo, corazón, riñones, páncreas, cerebro, nódulo linfático poplíteo y timo) se extrajeron y pesaron. La mitad del tejido se usó para ensayos histológicos y la otra mitad se homogeneizó usando un homogeneizador de tejidos Omni (Omni International). El suero se obtuvo de sangre completa del seno intraorbital del ojo. La cantidad de virus infeccioso se determinó mediante ensayo de plaqueo en células BHK tal como está descrito (Domingo, E., M. Davila, and J. Ortin. 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. Gene 11: 333-46).

Análisis hematológicos. La sangre se recogió del seno intraorbital del ojo en 5 μ M EDTA a diferentes tiempos post-inoculación. La muestra de sangre anticoagulada se mezcló y analizó en un AcT Hematology analyzer (Beckman Coulter, Hialeah, FL) siguiendo direcciones del fabricante. El porcentaje de distintas poblaciones de leucocitos (monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos) se determinó mediante tinción con May-Grunwald-Giemse y conteo de al menos 300 células por campo.

Histopatología. Muestras de diferentes tejidos y órganos se fijaron en tampón formalina al 10% (pH 7.2) para estudios histopatológicos. Después de la fijación, las muestras se deshidrataron con una serie de alcohol/xilol y embebido en parafina. Se cortaron secciones de 4 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su análisis.

Aislamiento de células del bazo y análisis por citometría de flujo. Los bazos se obtuvieron de ratones C57BL/6 infectados con VFA C-S8c1. Una suspensión de células individuales se obtuvo por disrupción mecánica. Las células se concentraron por centrifugación y resuspendidas en tampón de tinción (PBS conteniendo 2% (vol/vol) de suero bovino fetal y 0.2% (peso/vol) de NaN_3) para citometría de flujo. Para analizar la expresión de moléculas de superficie en las células se usaron anticuerpos monoclonales específicos, fluorocromos y citometría de flujo como está descrito (Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homann, H. Yamada, K. P. Campbell, J. C. de La Torre, and M. B. Oldstone. 2000. Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. J Exp Med 192: 1249-60). Los anticuerpos usados fueron rat anti-mouse CD8a-PerCp y rat anti-mouse CD4-FITC, (todos de BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Después de la tinción, las células se fijaron en PBS/1% suero bovino fetal/4% PFA (peso/vol). Las células se adquirieron usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las células muertas se excluyeron en base a "forward y side light scatter". Los datos se analizaron con FlowJo (Tree Star, San Francisco, CA, USA) y CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Respuesta a anticuerpo. Anticuerpos (Ab) anti-VFA se detectaron por ELISA tal y como está descrito (Novella, I. S., B. Borrego, M. G. Mateu, E. Domingo, E. Giralt, and D. Andreu. 1993. Use of substituted and tandem-repeated peptides to probe the relevance of the highly conserved RGD tripeptide in the immune response against foot-and-mouth disease virus. FEBS Lett 330:253-9). Brevemente, microplatos de 96 pocillos de polivinilcloride (PVC) (Flow Laboratories) fueron tapizados con VFA C-S8c1 purificado e incubados a 4°C durante toda la noche. El suero de los ratones se diluyó en PBS/3% ovoalbúmina y analizado para la presencia de anticuerpos IgG con un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (BioRad). Se reveló con O-Phenylenediamine- H_2O_2 (Sigma) como sustrato de la peroxidasa y la absorbancia se leyó a 490 nm en un Microplate Reader (Labsystems Multiskan MS). Los títulos de ELISA se dan como el inverso de la dilución más alta que dio una $OD_{490} > 0.200$. Suero de ratones sin infectar se usaron como control y fue uniformemente negativo a la dilución más baja usada, 1:10.

Inmunizaciones. Grupos de 18 ratones C57BL/6 se inmunizaron dos veces consecutivas por inyección ip con gradient-purified binary ethylenimine (BEI)-inactivado VFA C-S8c1 (Bahnemann, H. G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch Virol 47: 47-56) o PBS (controles) emulsionado en adyuvante incompleto de Freud, administrados con 2 semanas de separación. Los ratones fueron 2 semanas después de la última inmunización inoculados sc con 10^4 UFPs de VFA C-S8c1 (dosis letal). Fueron sangrados antes de cada inmunización y después del desafío con el virus. Los sueros fueron testados para anticuerpos anti-VFA por ELISA como se describe más arriba.

Análisis estadístico. Para el procesamiento de los datos, análisis y representación de gráficos se ha usado el programa Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, California). Diferencias estadísticas se determinaron usando un test de Student ($p < 0.05$).

REIVINDICACIONES

1. Animal útil como modelo experimental de una infección del virus de la fiebre aftosa (VFA) **caracterizado** porque es un roedor adulto que contiene una cantidad adecuada del VFA para provocar un proceso infeccioso sistémico y letal.
2. Animal según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un ratón adulto.
3. Animal según la reivindicación 2 **caracterizado** porque es un ratón C57BL/6.
4. Animal según la reivindicación 2 **caracterizado** porque es un ratón BALB/C.
5. Animal según la reivindicación 2 **caracterizado** porque es un ratón Swiss.
6. Animal según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el VFA es un virus perteneciente a cualquiera de los serotipos antigénicamente identificados: O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT3 y Asia 1, sus subtipos, sus variantes antigénicas o sus subespecies.
7. Procedimiento de obtención del animal según las reivindicaciones 1 a la 6 **caracterizado** porque consiste en la inoculación del VFA en un roedor adulto, preferentemente un ratón adulto, en una localización que impide la intervención del sistema inmune, preferentemente por vía subcutánea (sc) en la almohadilla plantar de la pata del animal o intraperitoneal (ip), y en una cantidad adecuada de VFA para inducir un proceso de infección sistémico y letal.
8. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la inoculación se realiza por vía subcutánea (sc) en la almohadilla plantar de la pata del ratón.
9. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la inoculación se realiza por vía intraperitoneal (ip).
10. Procedimiento de obtención del animal según las reivindicaciones 7 a la 9 **caracterizado** porque el VFA es seleccionado entre los pertenecientes a cualquiera de los serotipos antigénicamente identificados: O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT3 y Asia 1, sus subtipos, sus variantes antigénicas o sus subespecies.
11. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 10 **caracterizado** porque el VFA se selecciona entre los pertenecientes al siguiente grupo: A22, SAT-1, CS8c-1, O, CS8c1p100 y MARL3.
12. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la dosis adecuada de VFA se encuentra entre 10^5 y 10^7 UFPs de VFA y, más preferentemente, entre 10^3 y 10^6 UFPs de VFA.
13. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la dosis adecuada de VFA se encuentra entre 10^3 y 10^6 UFPs de VFA.
14. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el animal es un ratón adulto C57BL/6 y la dosis adecuada de VFA utilizada es de 10^4 UFPs.
15. Procedimiento de obtención del animal según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el animal es un ratón adulto BALB/C y la dosis adecuada de VFA utilizada es de 10^5 UFPs.
16. Uso del procedimiento de obtención según las reivindicaciones 7 a la 15 para la obtención del animal según las reivindicaciones 1 a la 6.
17. Uso del animal según las reivindicaciones 1 a la 6 y del procedimiento de obtención según las reivindicaciones 7 a la 15 para realizar estudios de la patología del VFA, para estudiar diferencias en la virulencia entre distintas variantes de VFA, para estudiar los determinantes de dicha virulencia, así como para evaluar vacunas y antivirales efectivos contra el VFA.
18. Uso del animal según la reivindicación 17 **caracterizado** porque consiste en la evaluación de la eficacia de una vacuna frente al virus de la fiebre aftosa que comprende los siguientes pasos:
 - a) vacunación de un roedor adulto con una cantidad adecuada de la vacuna a evaluar,
 - b) determinación del estado de inmunización del animal,
 - c) desafío o infección del animal de b) con una cantidad adecuada del VFA, y

ES 2 317 714 B1

- d) determinación de la eficacia de la vacuna de acuerdo a los niveles de mortalidad entre los animales vacunados y el grupo control (no vacunado).

5 19. Uso según la reivindicación 18 **caracterizado** porque la vacuna evaluada es una vacuna de VFA inactiva químicamente.

20. Uso según la reivindicación 18 **caracterizado** porque la vacuna evaluada es una vacuna atenuada de VFA.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

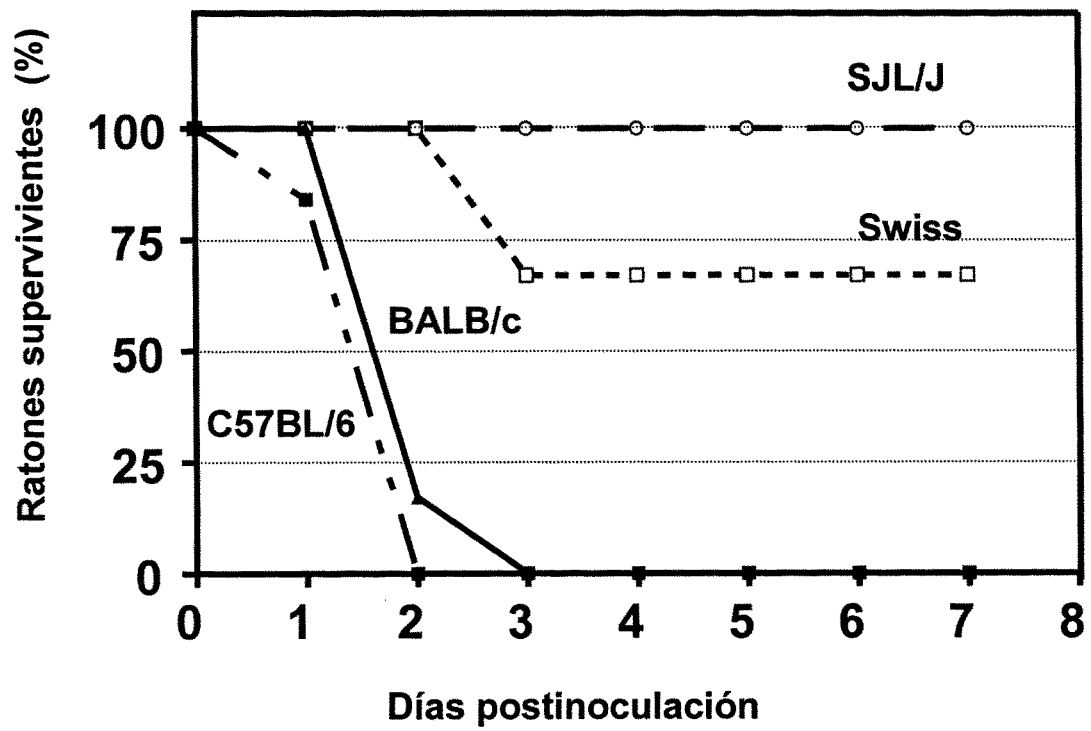


Figura 1

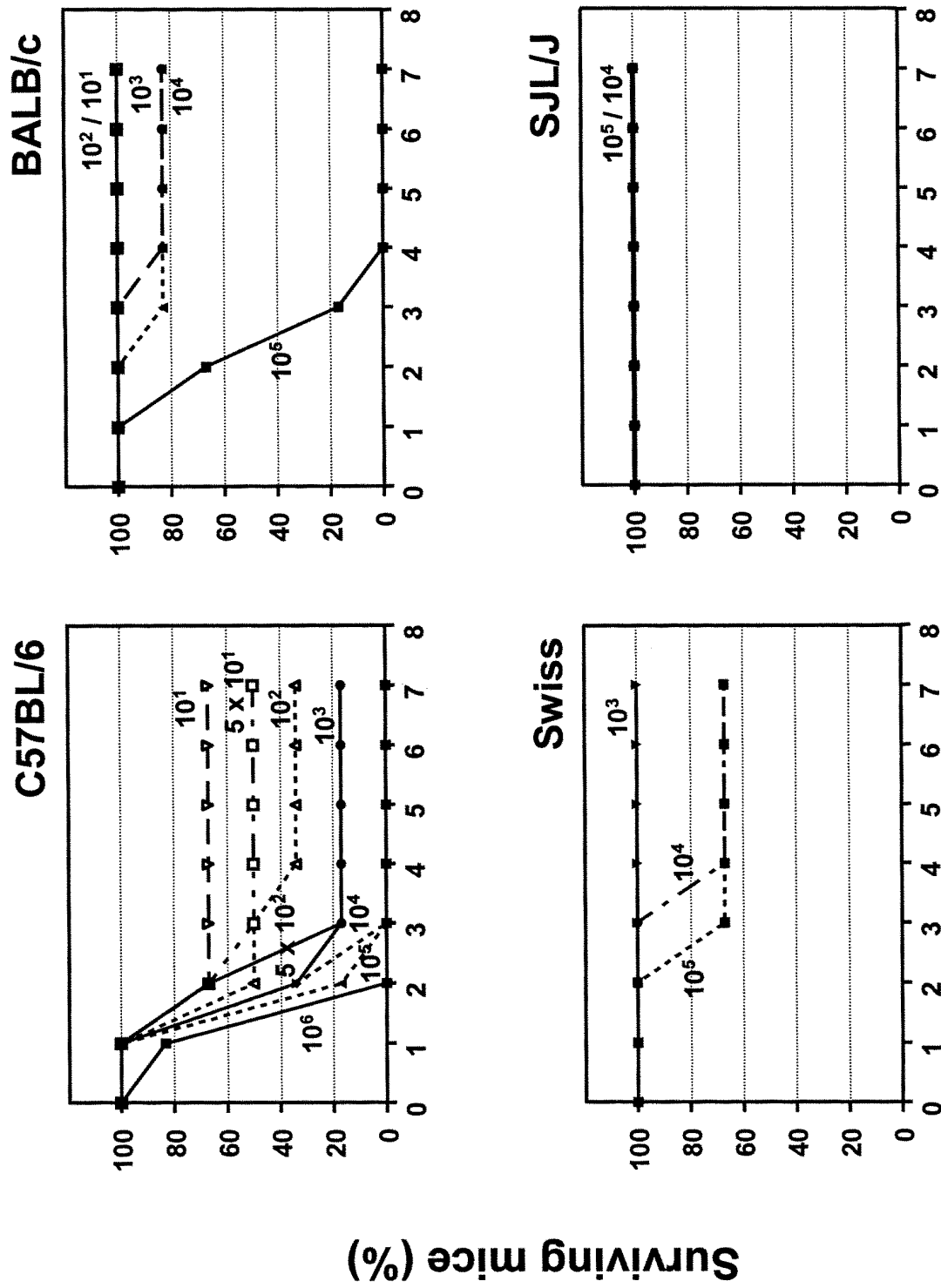


Figura 2

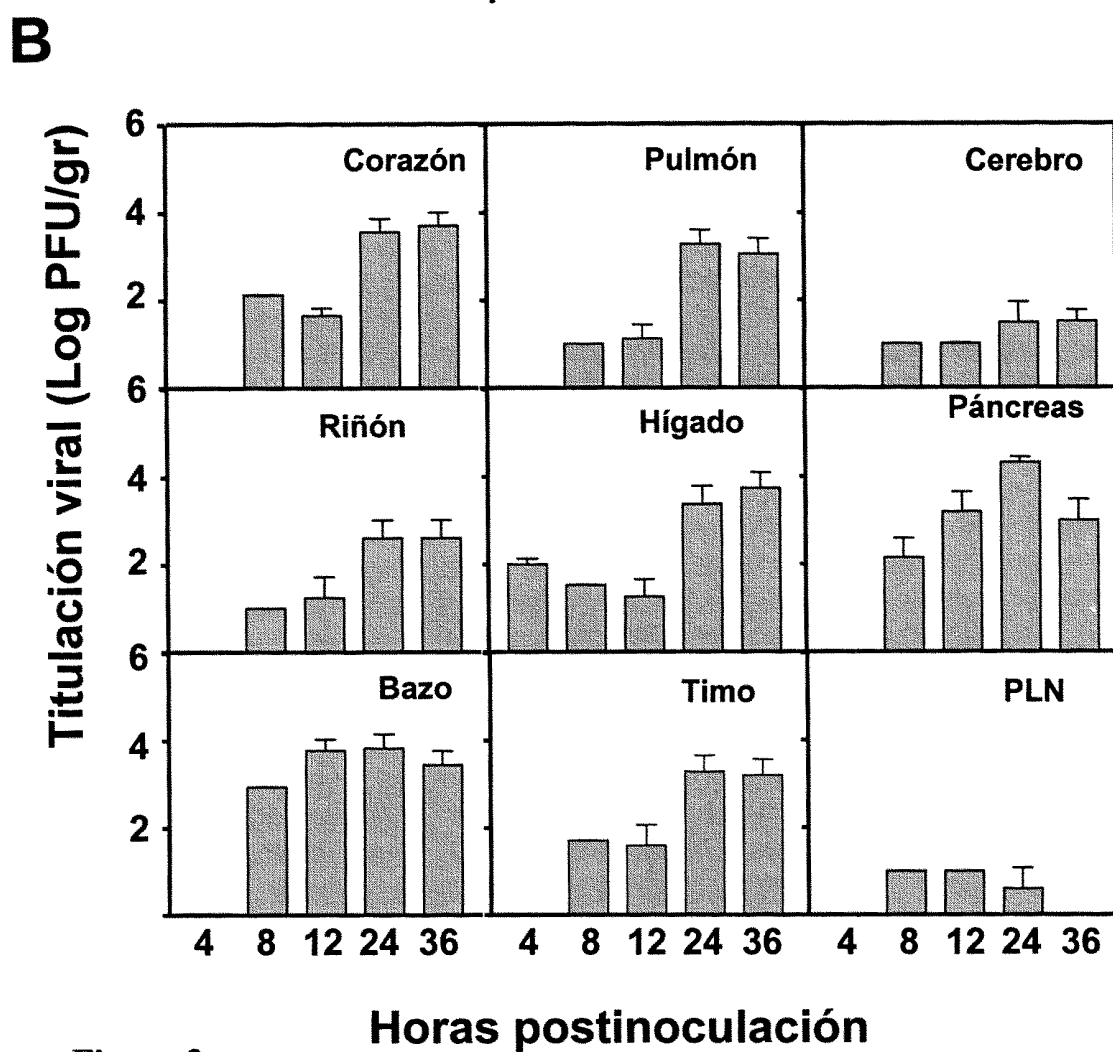
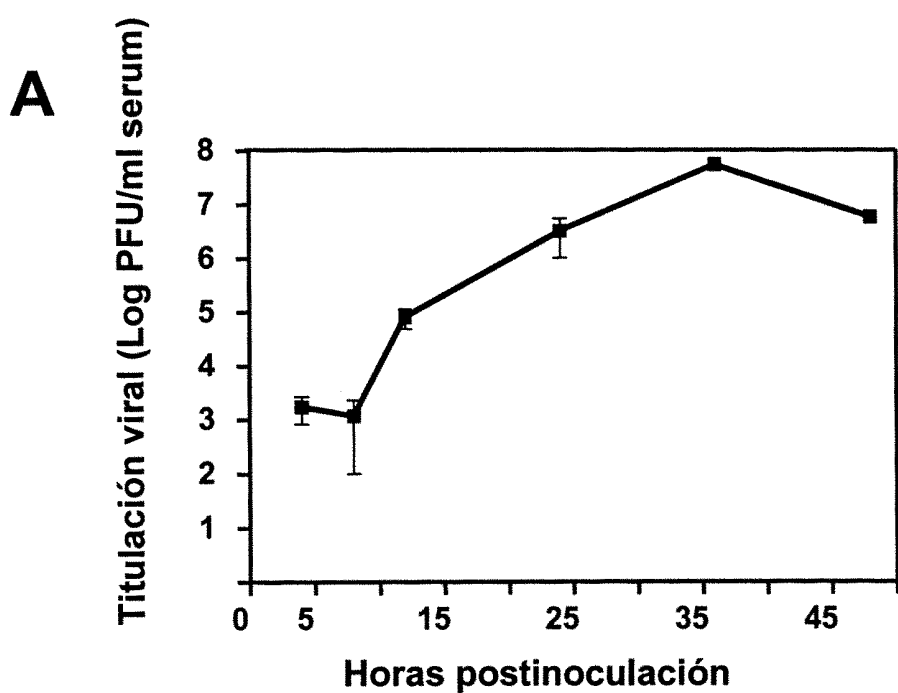
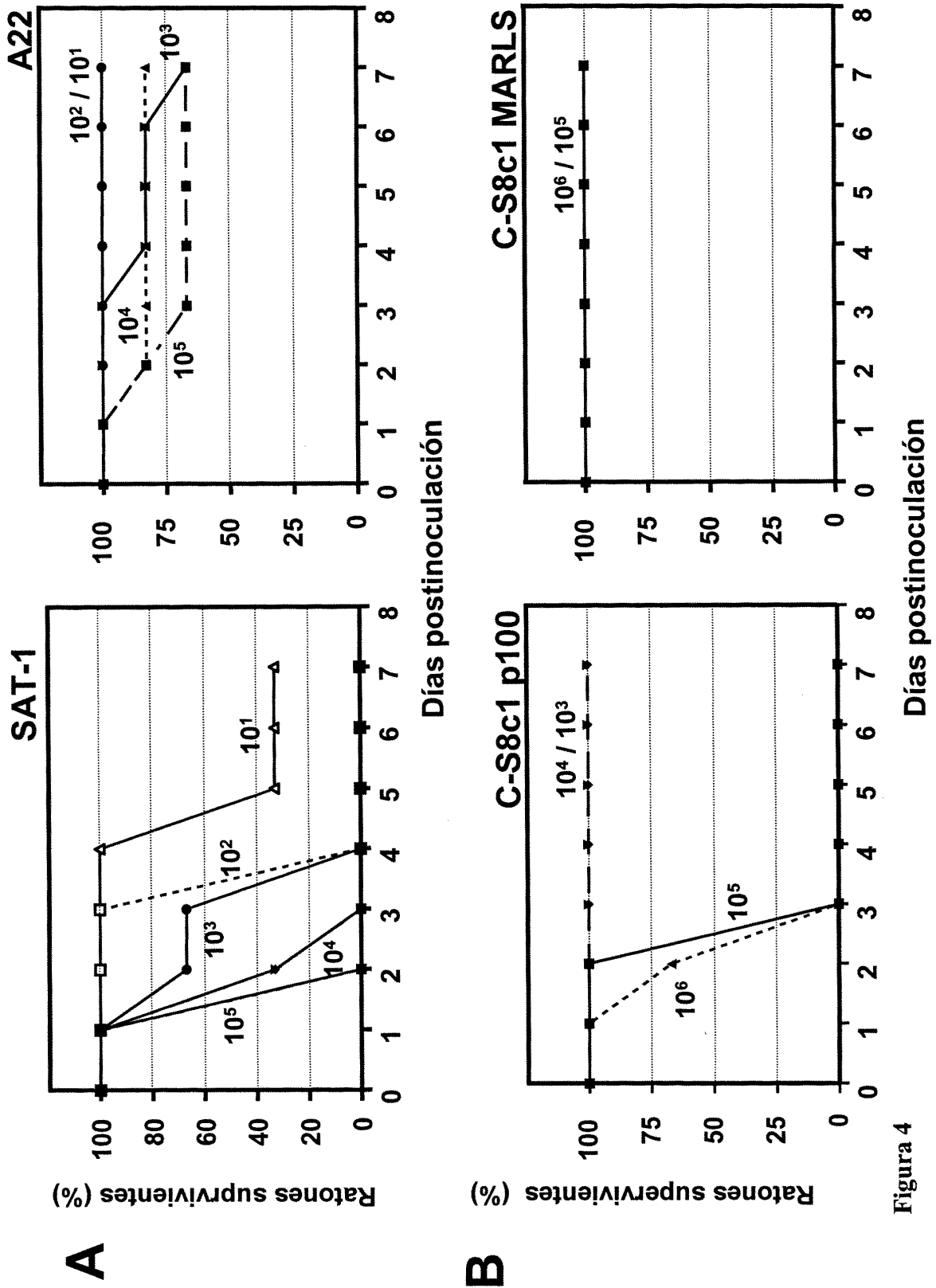


Figura 3



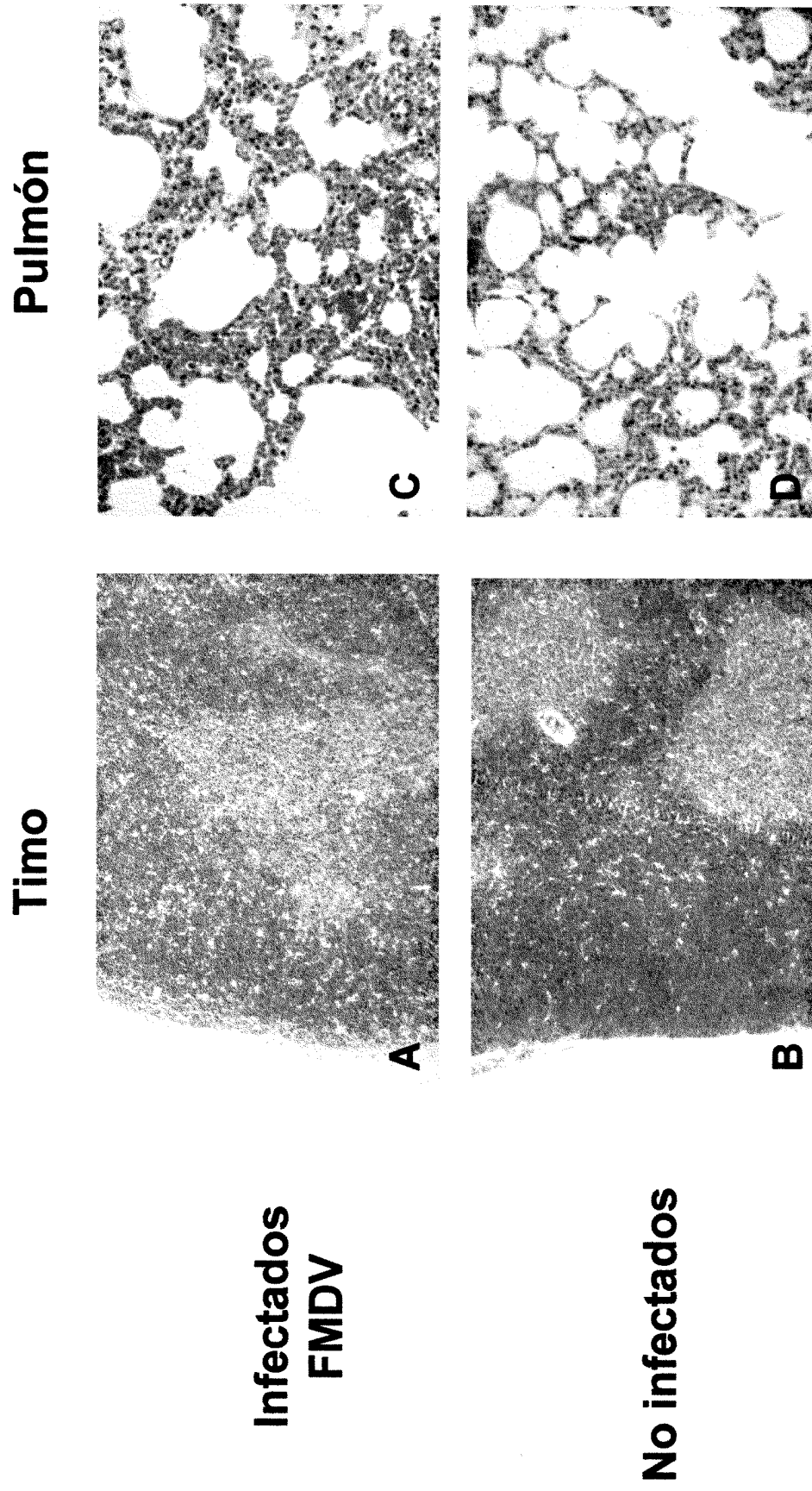


Figura 5

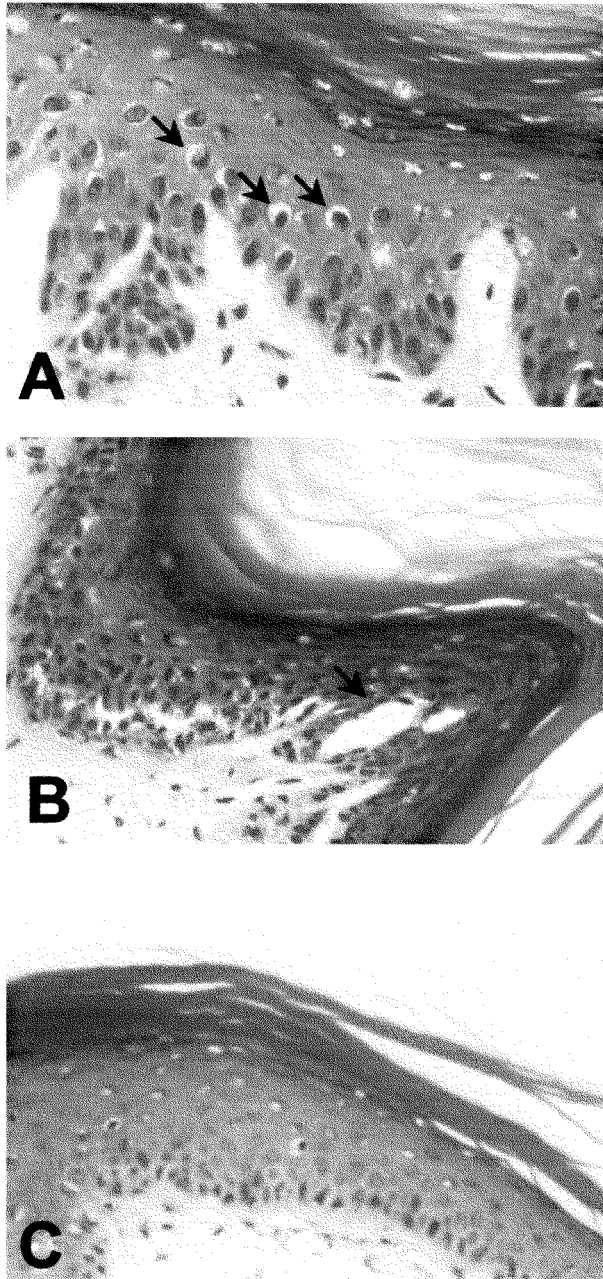


Figura 6

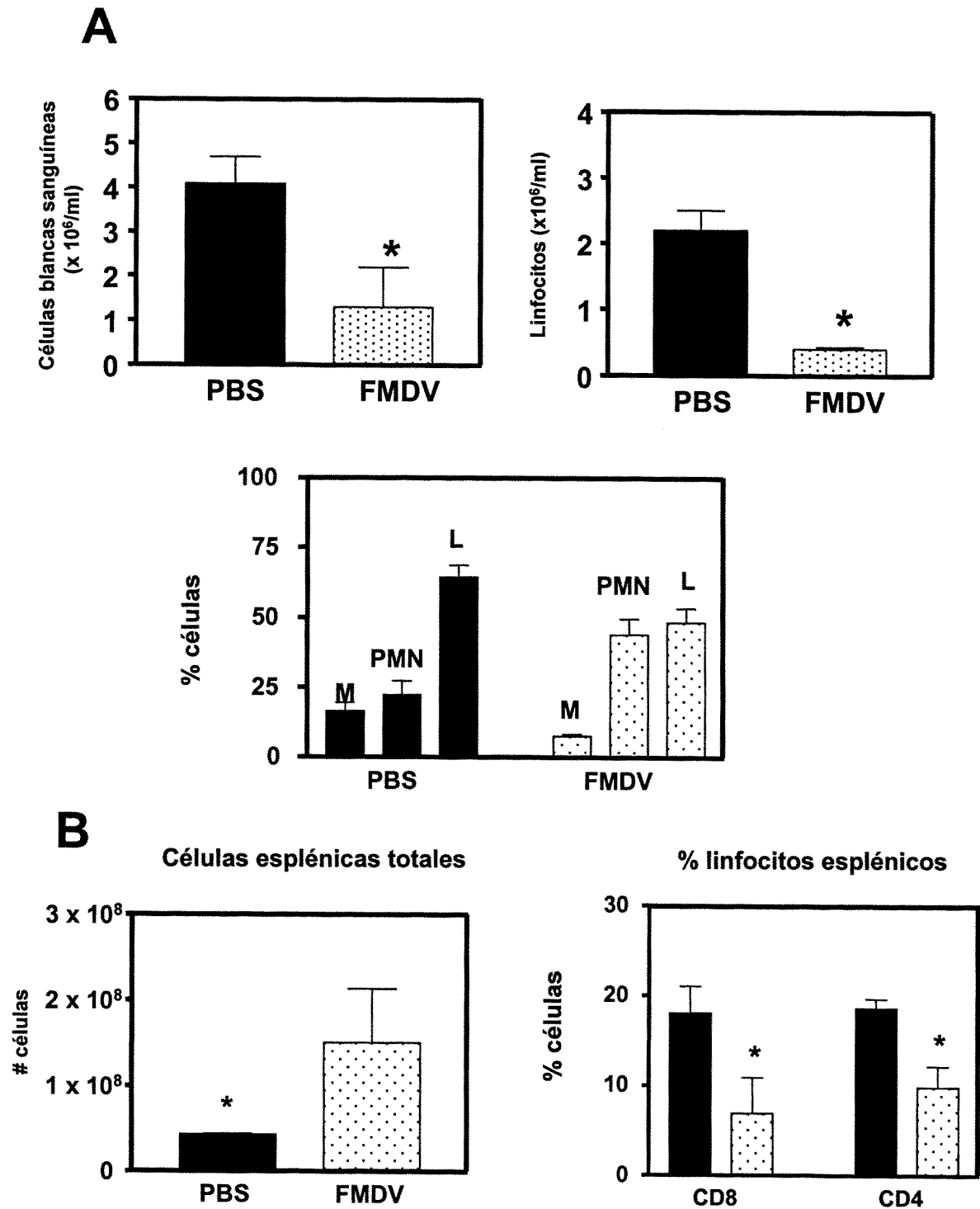
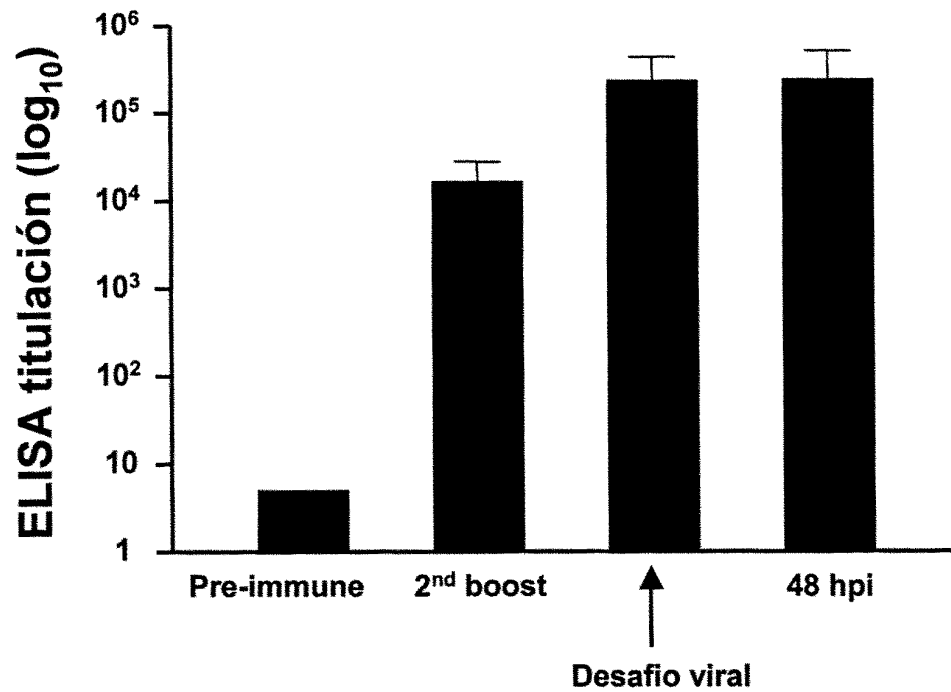


Figura 7

A



B

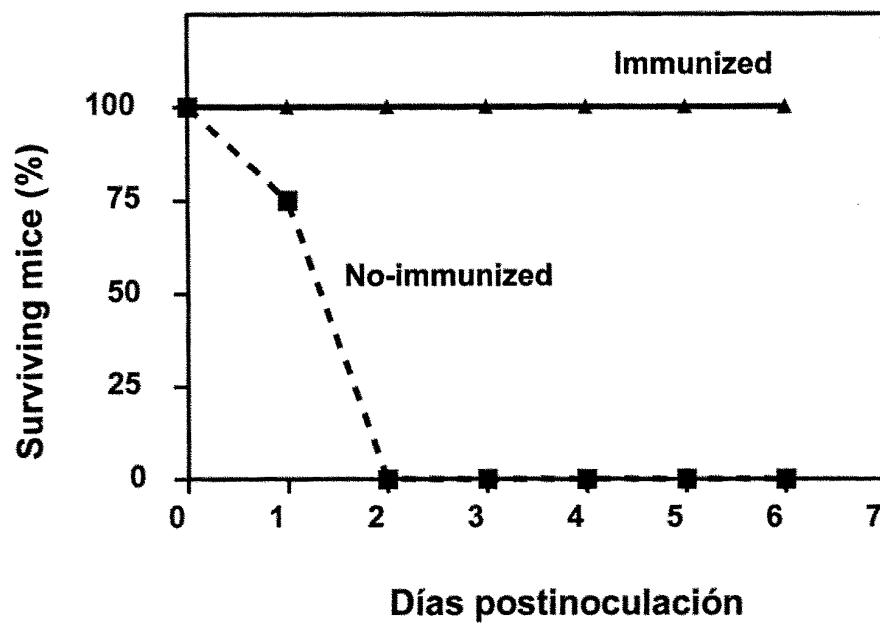


Figura 8



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 317 714

⑫ Nº de solicitud: 200401839

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: A01K 67/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SUBAK-SHARPE, H., "The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. Arc. Gesamte Virusforsch (1961), 11, 373-399. Citado en la solicitud.	1-7,9-10, 16-20
A		8,11-15
X	SUBAK-SHARPE, H., et al., "Factors influencing the dynamics of multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice" Arc. Gesamte Virusforsch (1962), XII: 600-619. Citado en la solicitud.	1-7,9-10, 16-20
A		8,11-15
A	FERNANDEZ FM., et al., "Foot-and-Mouth Disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice" Veterinary Microbiology (1986) 12, páginas 15-24. Citado en la solicitud.	1-20
A	HEATLEY W., et al., "Influence of route inoculation and strain of mouse on infectivity titrations of the virus of Foot-and-Mouth Disease" Nature (1960), 186, páginas 909-911.	1-20
A	PIATTI P.G., et al., "Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice" Journal of general Virology (1991), 72, páginas 1691-1694.	1-20
A	CAMPBELL C.H., et al., "Influence of litter size, age, variation and selective breeding of mice on susceptibility to foot-and-mouth disease" Am. J. Vet. Res. (1968) 29, 685-691.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.02.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1